

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. April 2002 (25.04.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/33057 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 9/00 (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/11958

(22) Internationales Anmeldedatum: 16. Oktober 2001 (16.10.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität: 100 51 175.9 16. Oktober 2000 (16.10.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HAUER, Bernhard [DE/DE]; Merowingerstrasse 1, 67136 Fussgönheim (DE). SCHMID, Rolf [DE/DE]; In den Riedwiesen 3, 70329 Stuttgart (DE). MERKL, Rainer [DE/DE]; Silberkuhlenweg 5, 37120 Bovenden (DE). BLASCO, Francesca [IT/DE]; Achalmstrasse 91, 73734 Esslingen (DE).

(74) Anwälte: KINZEBACH, Werner usw.; Kinzebach & Partner, Sternwartstrasse 4, 81679 München (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



A2

(54) Title: CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASES CONSISTING OF THERMOPHILIC BACTERIA

(54) Bezeichnung: CYTOCHROM P450 MONOOXYGENASEN AUS THERMOPHILEN BAKTERIEN

(57) Abstract: The invention relates to novel cytochrome P450 monooxygenases consisting of thermophilic bacteria, especially the species *Thermus* sp., nucleotide sequences coding for the same, the recombinant production of said monooxygenases and the use thereof for the microbiological oxidation of organic compounds.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft neuartige cytochrom P450 Monooxygenasen aus thermophilen Bakterien, insbesondere der Gattung *Thermus* sp., dafür kodierende Nucleotidsequenzen, die rekombinante Herstellung dieser Monooxygenasen und deren Verwendung zur mikrobiologischen Oxidation organischer Verbindungen.

WO 02/33057

Cytochrom P450 Monooxygenasen aus thermophilen Bakterien

Die Erfindung betrifft neuartige Cytochrom P450 Monooxygenasen aus thermophilen Bakterien, insbesondere der Gattung *Thermus* sp., dafür kodierende Nucleotidsequenzen, die rekombinante Herstellung dieser Monooxygenasen und deren Verwendung zur mikrobiologischen Oxidation organischer Verbindungen.

Cytochrom P450 Monooxygenasen besitzen die Fähigkeit technisch interessante Oxygenierungsreaktionen zu katalysieren und werden daher seit einiger Zeit intensiv untersucht. So wurde beispielsweise die Cytochrom P450 Monooxygenase BM-3 aus *Bacillus megaterium* isoliert und charakterisiert und ist mittlerweile auf rekombinantern Weg zugänglich (vgl. z.B. DE-A-199 35 115).

Diese Cytochrom P450-Monooxygenase katalysiert gewöhnlich die subterminale Hydroxylierung langkettiger, gesättigter Säuren und der entsprechenden Amide und Alkohole davon oder die Epoxydation ungesättigter langkettiger Fettsäuren oder gesättigter Fettsäuren mit mittlerer Kettenlänge. Die optimale Kettenlänge gesättigter Fettsäuren beträgt 14 bis 16 Kohlenstoffatome.

Die Struktur der Häm-Domäne von P450 BM-3 wurde durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Die Substratbindungsstelle liegt in Form einer langen tunnelartigen Öffnung vor, welche von der Moleküloberfläche bis hin zum Häm-Molekül reicht und wird fast ausschließlich von hydrophoben Aminosäureresten begrenzt. Die einzigen geladenen Reste an der Oberfläche der Häm-Domäne sind die Reste Arg47 und Tyr51. Man nimmt an, daß diese an der Bindung der Carboxylatgruppe des Substrates durch Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt sind. Durch gezielte Einführung von Punktmutationen ist es zwischenzeitlich gelungen, das Substratspektrum dieses Enzyms zu erweitern. So können nunmehr auch kürzer- als auch längerkettige Carbonsäuren, Alkane, Alkene, Cycloalkane, Cycloalkene und verschiedene Aromaten durch dieses Enzym oxidiert werden (vgl. DE-A-199 35 115, 199 55 605, 100 11 723 und 100 14 085).

Um die industrielle Anwendbarkeit dieser Enzymklasse weiter zu verbessern, wäre es daher wünschenswert neue Cytochrom P450-Monoxygenasen zu finden, welche besser an industrielle Produktionsbedingungen angepasst sind, wie z.B. Enzyme mit erhöhter thermischer Stabilität.

5

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Bereitstellung von Cytochrom P450-Monoxygenasen, welche besser an industrielle Produktionsbedingungen angepasst sind

10 Obige Aufgabe wurde gelöst durch Bereitstellung einer Cytochrom P450 Monoxygenase, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie eine Aminosäuresequenz aufweist, welche eine Teilsequenz von Aminosäurerest Pro328 bis Glu345 gemäß SEQ ID NO:2 und vorzugsweise außerdem eine Teilsequenz von Aminosäurerest Val216 bis Ala227 gemäß SEQ ID NO:2 umfasst.

15

Erfindungsgemäß bevorzugte Cytochrom P450 Monoxygenasen weisen eine Aminosäuresequenz auf, welche wenigstens eine weitere Teilsequenz umfasst, die ausgewählt ist unter einer Teilsequenzen von wenigstens 10 aufeinanderfolgenden Aminosäure aus den durch die Aminosäurereste Met1 bis Phe327 und Gly346 bis

20 Ala389 gemäß SEQ ID NO:2 vorgegebenen Sequenzbereichen.

Eine besonders bevorzugte Cytochrom P450 Monoxygenase besitzt eine Aminosäuresequenz, welche im wesentlichen SEQ ID NO: 2 entspricht.

25 Erfindungsgemäße Cytochrom P450 Monoxygenasen sind insbesondere aus thermophilen Bakterien, vorzugsweise der Gattung *Thermus* sp., wie z.B. der Spezies *Thermus thermophilus*, Stamm HB27 (hinterlegt bei der DSM unter der Nummer DSM7039) isolierbar. „Thermophile“ Bakterien erfüllen erfindungsgemäß die Temperaturtoleranzkriterien nach H.G. Schlegel, Allgemeine Mikrobiologie, Thieme
30 Verlag Stuttgart, 5. Auflage, Seite 173, für thermophile und extrem thermophile Organismen (d.h. Wachstumsoptimum bei über 40 °C).

Die erfindungsgemäßen Monooxygenase sind vorzugsweise durch eine erhöhte Temperaturstabilität gekennzeichnet. Diese drückt sich in einem in Vergleich zum P450 BM-3 aus *Bacillus megaterium* geringeren Aktivitätsverlust bei erhöhter Temperatur (z.B. in einem Bereich von 30 bis 60 °C, pH 7,5, 25mM Tris/HCl) aus.

5

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird erfindungsgemäß eine Cytochrom P450 Monooxygenase aus dem thermophilen Bakterium *T. thermophilus* bereitgestellt. Das Protein besitzt ein Molekulargewicht von etwa 44 kDa (bestimmt durch SDS-Gelelektrophorese), ist löslich und zeigt im reduzierten Zustand, oxidierten Zustand und als Carbonyl-Addukt ein Absorptionspektrum analog zu dem anderer P450 Enzyme. Aus Sequenzvergleichen dieses erfindungsgemäßen Enzyms aus *T. thermophilus* und anderen bekannten P450 Enzymen konnten folgende Identitäten bestimmt werden: P450 BM3, 32% Identität; CYP119, 29% Identität; P450eryF, 31% Identität. Das erfindungsgemäße Enzym zeigt eine außerordentliche Thermostabilität, veranschaulicht durch eine Schmelztemperatur von etwa 85°C, welcher Wert um 30°C über demjenigen für P450cam liegt.

20 Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Oligonukleotide, welche mit einer Nukleinsäuresequenz hybridisieren, die für eine erfindungsgemäße Cytochrom P450 Monooxygenase kodiert.

Insbesondere sind Gegenstand der Erfindung auch solche Oligonukleotide, welche eine Nukleinsäuresequenz umfassen, die im wesentlichen komplementär ist zu einem wenigstens 30 bis 45 aufeinanderfolgende Nukleotidreste umfassenden Nukleotidsequenzbereich gemäß SEQ ID NO:1.

30 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Polynukleotide, welche mit einem Oligonukleotid gemäß obiger Definition hybridisieren und für eine Cytochrom P450 Monooxygenase kodieren, insbesondere eine Cytochrom P450 Monooxygenase aus anderen Mikroorganismen, wie z.B. solchen der Gattung *Thermus* sp..

Gegenstand der Erfindung sind insbesondere auch Polynukleotide, die für eine Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß obiger Definition kodieren, sowie dazu komplementäre Polynukleotide.

5 Bevorzugte Polynukleotide sind solche, die im wesentlichen eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 besitzen, sowie die dazu komplementären und davon abgeleiteten Nukleinsäuresequenzen.

10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Expressionskassetten zur rekombinanten Herstellung erfindungsgemäßer Monooxygenasen, umfassend wenigstens eine regulatorische Nukleinsäuresequenz operativ verknüpft mit wenigstens einer der oben angegebenen Polynukleotide.

15 Weiter Gegenstände der Erfindung betreffen rekombinanter Vektoren, welche wenigstens ein Polynukleotid oder wenigstens eine Expressionskassette gemäß obiger Definition tragen; sowie Mikroorganismen, enthaltend wenigstens einen solchen rekombinanten Vektor; sowie Verfahren zur Herstellung erfindungsgemäßer Cytochrom P450 Monooxygenasen, bei welchen man einen Mikroorganismus, welcher Cytochrom P450 Monooxygenase produziert, kultiviert und die Monooxygenase aus 20 der Kultur isoliert.

25 Die erfindungsgemäßen Enzyme und davon ableitbaren Mutanten sind als Biokatalysatoren für unterschiedliche biochemische Oxygenierungsreaktionen organischer Verbindungen von technischer Bedeutung brauchbar. In analoger Weise sind auch die erfindungsgemäßen rekombinanten Mikroorganismen zur Durchführung solcher Oxygenierungsreaktionen einsetzbar.

30 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation einer organischen Verbindung, wobei man diese Verbindung mit wenigstens einer erfindungsgemäßen Cytochrom P450 Monooxygenase umsetzt.

Vorzugsweise wird dieses Verfahren so durch geführt, dass man

a1) einen rekombinanten Mikroorganismus gemäß obiger Definition in

einem Kulturmedium, in Gegenwart der exogenen (von außen zugesetzten) oder intermediär gebildeten organischen Verbindung, welche ein Substrat der Monooxygenase ist, vorzugsweise in Gegenwart von Sauerstoff und gegebenenfalls einem Elektronendonator, kultiviert; oder

5 a2) ein Substrat-haltiges Reaktionsmedium, vorzugsweise in Gegenwart von Sauerstoff und einem Elektronendonator, mit einer erfindungsgemäßen Cytochrom P450 Monooxygenase inkubiert; und

b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.

10

Das exogene oder intermediär gebildete Substrat kann dabei ausgewählt sein unter:

a) gegebenenfalls substituierten N-, O- oder S-heterocyclischen ein-, zwei- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen;

b) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen Aromaten;

15 c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen;

d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkenen; und

e) aliphatischen, vorzugsweise terminal gesättigten, Carbonsäuren.

Nach einer ersten bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens wird 20 die Oxidation durch Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von mindestens etwa 20 °C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt.

Nach einer zweiten bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens setzt 25 man als exogenes Substrat wenigstens eine Verbindung, ausgewählt unter den oben definierten Gruppen a) bis e), einem Medium zu und führt die Oxidation durch enzymatische Umsetzung des substrathaltiges Mediums in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Temperatur von mindestens etwa 20°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durch, wobei das substrathaltige Medium außerdem bezogen auf das Substrat einen etwa 10- bis 100-fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten 30 (Elektronendonator) enthält.

Obige Verfahren können bevorzugt in Bioreaktoren durchgeführt werden. Gegenstand der Erfindung sind daher solche Bioreaktoren, umfassend wenigstens eine erfindungsgemäße Monooxygenase oder wenigstens einen rekombinanten Mikroorganismus, gegebenenfalls jeweils in immobilisierter Form.

5

Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung einer Cytochrom P450 Monooxygenase, eines Vektors oder eines Mikroorganismus gemäß vorliegender Erfindung zur mikrobiologischen Oxidation oben genannter organischer Verbindungsklassen.

10 Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf beiliegenden Figuren näher erläutert. Dabei zeigt

Figur 1 einen Sequenzvergleich von P450 aus *Thermus thermophilus* mit der Häm-Domäne von P450 BM3 aus *Bacillus megaterium*. Doppelt unterstrichen ist dabei die Häm-Bindungsstelle gezeigt (Cys400 in P450 BM3 ist der Cysteinrest, der mit dem Eisenatom der prosthetischen Gruppe koordiniert). Einfach unterstrichen ist die Region die in Kontakt steht mit dem T-Ende der Fettsäurekette. Die Grad der Übereinstimmung ist durch verschiedenen Symbole gekennzeichnet ("*" = identische Reste; ":" und "." = ähnliche Reste).

20

Figur 2 zeigt das Ergebnis eines Vergleichstests zur Bestimmung der Thermostabilität von P450 BM3 und P450 aus *Thermus* sp.. Die Thermostabilität wurde spektrometrisch im Wellenlängenbereich zwischen 400 und 500nm über den Häm-Gruppen-Gehalt bestimmt.

25

Erfindungsgemäß mit umfasst sind ebenfalls „funktionale Äquivalente“ der konkret offenbarten neuen P450 Monooxygenasen.

„Funktionale Äquivalente“ oder Analoga der konkret offenbarten Monooxygenasen sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung davon verschiedene Enzyme, welche weiterhin die gewünschte Substratspezifität im Rahmen wenigstens einer der oben bezeichneten Oxidationsreaktionen a) bis e) besitzen und /oder im Vergleich zu P450 BM3 eine erhöhte Thermostabilität, z.B. bei Temperaturen im Bereich von et-

wa 30 bis 60 °C und gegebenenfalls höheren Temperaturen nach 30-minütiger Behandlung in 25mM Tris/HCl, besitzen.

Unter "funktionalen Äquivalenten" versteht man erfindungsgemäß insbesondere

5 Mutanten, welche in wenigstens einer der oben genannten Sequenzpositionen eine andere als die konkret genannte Aminosäure aufweisen aber trotzdem eine der oben genannten Oxidationsreaktionen katalysieren. "Funktionale Äquivalente" umfassen somit die durch eine oder mehrere, wie z.B. 1 bis 30 oder 1 bis 20 oder 1 bis 10, Aminosäure-Additionen, -Substituenten, -Deletionen und/oder -Inversionen er-
10 hältlichen Mutanten, wobei die genannten Veränderungen in jeglicher Se- quenzposition auftreten können, solange sie zu einer Mutante mit dem erfindungs- gemäßen Eigenschaftsprofil führen. Funktionale Äquivalenz ist insbesondere auch dann gegeben, wenn die Reaktivitätsmuster zwischen Mutante und unverändertem Enzym qualitativ übereinstimmen, d.h. beispielsweise gleiche Substrate mit unter-
15 schiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt werden.

Erfindungsgemäß mit umfasste „funktionale Äquivalente“ weisen eine von SEQ ID NO:2 in mindestens einer Position abweichende Aminosäuresequenz auf, wobei die Veränderung in der Sequenz die Monooxygenase Aktivität vorzugsweise nur unwe-
20 sentlich, das heißt um nicht mehr als etwa \pm 90%, insbesondere \pm 50% oder nicht mehr als \pm 30% verändert. Diese Veränderung kann unter Verwendung eines Refe- renzsubstrates, wie zum Beispiel β -Ionon, unter standardisierten Bedingungen (zum Beispiel 0,1 bis 0,5 M Substrat, pH-Bereich 6 bis 8, insbesondere 7; T = 60 bis 70°C, insbesondere 65°C) bestimmt werden.

25 Erfindungsgemäß mit umfasste „funktionale Äquivalente“ sind Homologe zu den konkret offenbarten Proteinen. Diese besitzen wenigstens 60 %, vorzugsweise we- nigstens 75% ins besondere wenigsten 85 %, wie z.B. 90%, 95% oder 99%, Ho-
mologie zu einer der konkret offenbarten Sequenzen, berechnet nach dem Algo-
30 rithmus von Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85(8), 1988, 2444-
2448.

Homologe der erfindungsgemäßen Proteine oder Polypeptide können durch Mutagenese erzeugt werden, z.B. durch Punktmutation oder Verkürzung des Proteins.

Homologe des erfindungsgemäßen Proteine können durch Screening kombinatorischer Banken von Mutanten, wie z.B. Verkürzungsmutanten, identifiziert werden. Beispielsweise kann eine variegierte Bank von Protein-Varianten durch kombinatorische Mutagenese auf Nukleinsäureebene erzeugt werden, wie z.B. durch enzymatisches Ligieren eines Gemisches synthetischer Oligonukleotide. Es gibt eine Vielzahl von Verfahren, die zur Herstellung von Banken potentieller Homologer aus einer degenerierten Oligonukleotidsequenz verwendet werden können. Die chemische Synthese einer degenerierten Gensequenz kann in einem DNASyntheseautomaten durchgeführt werden, und das synthetische Gen kann dann in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Die Verwendung eines degenerierten Gensatzes ermöglicht die Bereitstellung sämtlicher Sequenzen in einem Gemisch, die den gewünschten Satz an potentiellen Proteinsequenzen codieren. Verfahren zur Synthese degenerierter Oligonukleotide sind dem Fachmann bekannt (Z.B. Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477).

"Funktionale Äquivalente" umfassen natürlich auch P450-Monoxygenasen, welche aus anderen Organismen, z.B. aus anderen als den hierin konkret genannten Bakterien, zugänglich sind, sowie natürlich vorkommende Varianten. Beispielsweise lassen sich durch Sequenzvergleich Bereiche homologer Sequenzregionen festlegen und in Anlehnung an die konkreten Vorgaben der Erfindung äquivalente Enzyme ermitteln.

Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe a) sind gegebenenfalls substituierte heterocyclische ein-, zwei- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen; insbesondere oxidierbare oder hydroxylierbare N-, O- oder S-heterocyclische ein-, zwei- oder mehrkernige aromatische Verbindungen. Sie umfassen z.B. zwei oder drei vier- bis siebengliedrige, insbesondere sechs- oder fünfgliedrige, kondensierte Ringe, wobei wenigstens einer, vorzugsweise alle Ringe aromatischen Charakter

besitzen und wobei wenigstens einer der aromatischen Ringe ein bis drei, vorzugsweise ein N-, O- oder S-Heteroatom im Ring trägt. In der gesamten Ringstruktur können gegebenenfalls ein oder zwei weitere gleiche oder verschiedene Heteroatome enthalten sein. Die aromatischen Verbindungen können weiterhin 1 bis 5 Substituenten an den Ring-Kohlenstoff- oder an den Heteroatomen tragen. Beispiele für geeignete Substituenten sind C₁ bis C₄-Alkyl, wie Methyl, Ethyl, n- oder i-Propyl oder n-, i- oder t- Butyl oder C₂ bis C₄-Alkenyl, wie Ethenyl, 1-Propenyl, 2-Propenyl, 1-Butenyl, 2-Butenyl oder 3-Butenyl, Hydroxyl und Halogen, wie F, Cl, und Br. Die genannten Alkyl- oder Alkenylsubstituenten können gegebenenfalls auch eine Keto- oder Aldehydgruppe aufweisen; Beispiele hierfür sind Propan-2-on-3-yl, Butan-2-on-4-yl, 3-Buten-2-on-4-yl. Nichtlimitierende Beispiele für geeignete heterocyclische Substrate sind insbesondere zweikernige Heterocyclen, wie Indol, N-Methylindol und die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon, wie z.B. 5-Chlor- oder 5-Brom-indol; sowie Chinolin und Chinolinderivate, wie z.B. 8-Methylchinolin, 6-Methylchinolin und Chinaldin; und Benzothiophen und die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon. Außerdem seien genannt dreikernige Heteroaromaten, wie Acridin, und die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon.

Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe b) sind gegebenenfalls substituierte ein- oder mehrkernige, insbesondere ein- oder zweikernige Aromaten, wie Benzol und Naphthalin. Die aromatischen Verbindungen können gegebenenfalls ein oder mehrfach substituiert sein und z.B. 1 bis 5 Substituenten an den Ring-Kohlenstoffatomen tragen. Beispiele für geeignete Substituenten sind C₁ bis C₄-Alkyl, wie Methyl, Ethyl, n- oder i-Propyl oder n-, i- oder t- Butyl, oder C₂ bis C₄-Alkenyl, wie Ethenyl, 1-Propenyl, 2-Propenyl, 1-Butenyl, 2-Butenyl oder 3-Butenyl, Hydroxyl und Halogen, wie F, Cl, und Br. Die genannten Alkyl- oder Alkenylsubstituenten können gegebenenfalls auch eine Keto- oder Aldehydgruppe aufweisen; Beispiele hierfür sind Propan-2-on-3-yl, Butan-2-on-4-yl, 3-Buten-2-on-4-yl. Der Aromat kann gegebenenfalls mit einem vier- bis siebengliedrigen, nichtaromatischen Ring kondensiert sein. Der nichtaromatische Ring kann gegebenenfalls eine oder zwei C-C-Doppelbindungen aufweisen, ein- oder mehrfach mit oben genannten Substituenten substituiert sein und gegebenenfalls ein oder zwei Ringhetero-

tome tragen. Beispiele für besonders brauchbare Aromaten sind einkernige Aromaten, wie Cumol, sowie zweikernige Substrate, wie Inden und Naphthalin, sowie die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon.

5

Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe c) sind geradkettige oder verzweigte Alkane oder Alkene mit 4 bis 15, vorzugsweise 6 bis 12 Kohlenstoffatomen.

Als Beispiele können genannt werden n-Pantan, n-Hexan, n-Heptan-, n-Oktan, n-Nonan, n-Decan, n-Undecan und n-Dodecan, sowie die ein- oder mehrfach verzweigten Analoga dieser Verbindungen, wie z.B. analoge Verbindungen mit 1 bis 3

10 Methyl-Seitengruppen; oder die ein- oder mehrfach, beispielsweise einfach ungesättigten Analoga der oben genannten Alkane.

Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe d) sind gegebenenfalls substituierte Cycloalkane und Cycloalkene. Beispiele hierfür sind Cyclopantan, Cyclopenten, Cyclohexan, Cyclohexen, Cycloheptan und Cyclohepten. Die Ringstruktur kann dabei ein- oder mehrfach substituiert sein und z.B. 1 bis 5 Substituenten gemäß obiger Definition für Verbindungen der Gruppen a) und b) tragen. Nicht-limitierendes Beispiel hierfür sind Ionone, wie α -, β - und γ -Ionon, sowie die entsprechenden Methylionone und Isomethylionone.

Erfindungsgemäß oxidierbare, Substrate der Gruppe e) sind geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ein- oder mehrfach ungesättigte C₈-C₃₀-Carbonsäuren, insbesondere Monocarbonsäuren, oder Carbonsäurederivate davon, wie Ester und 25 Amide. Als Beispiele sind terminal oder subterminal (T-1-, T-2- oder T-3-Position) hydroxylierbare gesättigte Monocarbonsäuren zu nennen.

Gegenstand der Erfindung sind auch Nukleinsäuresequenzen (einzel- und doppelsträngige DNA- und RNA-Sequenzen), kodierend für eine der obigen Monooxygenasen und deren funktionale Äquivalente. Weitere erfundungsgemäß Nukleinsäuresequenzen sind abgeleitet von SEQ ID NO:1 und unterscheiden sich davon durch Addition, Substitution, Insertion oder Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide,

kodieren aber weiterhin für eine Monoxygenase mit der gewünschten Eigenschaftsprofil.

Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten, wie z.B. Spleißvarianten, davon. Gegenstand sind ebenso durch konservative Nukleotidsubstitutionen (d.h. die betreffende Aminosäure wird durch eine Aminosäure gleicher Ladung, Größe, Polarität und/oder Löslichkeit ersetzt) erhältliche Sequenzen.

Weiterhin umfasst die Erfindung auch Nukleinsäuresequenzen, welchen mit oben genannten kodierenden Sequenzen hybridisieren oder dazu komplementär sind. Diese Polynukleotide lassen sich bei Durchmusterung von genomischen oder cDNA-Bibliotheken auffinden und gegebenenfalls daraus mit geeigneten Primern mittels PCR vermehren und anschließend beispielsweise mit geeigneten Sonden isolieren. Eine weitere Möglichkeit bietet die Transformation geeigneter Mikroorganismen mit erfindungsgemäßen Polynukleotiden oder Vektoren, die Vermehrung der Mikroorganismen und damit der Polynukleotide und deren anschließende Isolierung. Darüber hinaus können erfindungsgemäße Polynukleotide auch auf chemischem Wege synthetisiert werden.

Unter der Eigenschaft, an Polynukleotide „hybridisieren“ zu können, versteht man die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während unter diesen Bedingungen unspezifische Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu sollten die Sequenzen zu 70-100%, vorzugsweise zu 90-100%, komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze. Üblicherweise werden dazu Oligonukleotide ab einer Länge von 30 Basenpaaren eingesetzt. Unter stringenten Bedingungen versteht man beispielsweise in der Northern-Blot-

Technik die Verwendung einer 50 – 70 °C, vorzugsweise 60 – 65 °C warmen Waschlösung, beispielsweise 0,1x SSC-Puffer mit 0,1% SDS (20x SSC: 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat, pH 7,0) zur Elution unspezifisch hybridisierter cDNA-Sonden oder Oligonukleotide. Dabei bleiben, wie oben erwähnt, nur in hohem Maße komplementäre Nukleinsäuren aneinander gebunden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem Expressionskonstrukte, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für eine erfindungsgemäße Mutante kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte. Vorzugsweise umfassen solche erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor- und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter einer „operativen Verknüpfung“ versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Translationsverstärker, Enhancer, Polyadenylierungs- signale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen.

Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturgen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor das Strukturgen insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Beispiele für brauchbare Promotoren sind: cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, I-PR- oder im I-PL-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die gram-positiven Promotoren amy und SPO2, die Hefepromotoren ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH oder die Pflanzenpromotoren CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, not oder der Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z.B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der P_rP_t -Promotor.

5 10 Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

15 Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und die Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

20 25 Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Transkription möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten Monooxygenase-Nukleotidsequenz sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Bergman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Labo-

ratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

5 Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor insertiert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985)

10 entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus- und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

15

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vektoren sind rekombinante Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind und zur Produktion der Mutanten eingesetzt werden können. Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in *Current Protocols in Molecular Biology*, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, beschrieben.

Als Wirtsorganismen sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die eine Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ihrer Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate ermöglichen. Unter Wirtsorganismen sind beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Bevorzugte Organismen sind Bakterien, wie solche der Gattungen *Escherichia*, wie z. B. *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Bacillus* oder *Pseudomonas*, eukaryotische Mikroorga-

nismen, wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus*, höhere eukaryotische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise Sf9 oder CHO-Zellen.

Die Selektion erfolgreich transformierter Organismen kann durch Markergene erfolgen, die ebenfalls im Vektor oder in der Expressionskassette enthalten sind. Beispiele für solche Markergene sind Gene für Antibiotikaresistenz und für Enzyme, die eine farbgebende Reaktion katalysieren, die ein Anfärben der transformierten Zelle bewirkt. Diese können dann mittels automatischer Zellsortierung selektiert werden.

Erfolgreich mit einem Vektor transformierte Mikroorganismen, die ein entsprechendes Antibiotikaresistenzgen (z.B. G418 oder Hygromycin) tragen, lassen sich durch entsprechende Antibiotika-enthaltende Medien oder Nährböden selektieren. Markerproteine, die an der Zelloberfläche präsentiert werden, können zur Selektion mittels Affinitätschromatographie genutzt werden.

15 Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter-System, die Phagen λ oder ϕ oder andere temperante Phagen oder Transposons und/oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bildet ein Expressionssystem. Beispielsweise ist unter dem Begriff "Expressionssystem" die Kombination aus Säugetierzellen, wie CHO-Zellen, und Vektoren, wie pcDNA3neo-Vektor, die für Säugetierzellen geeignet sind, zu verstehen.

20 Gewünschterfalls kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen wie transgenen Tieren, wie insbesondere Mäusen oder Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden.

25 Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Verfahren zur rekombinanten Herstellung einer erfindungsgemäßen Monooxygenase, wobei man einen Monooxygenaseproduzierenden Mikroorganismus kultiviert, gegebenenfalls die Expression der Monooxygenase induziert und die Monooxygenase aus der Kultur isoliert. Die Monooxygenase kann so auch in großtechnischem Maßstab produziert werden, falls dies erwünscht ist.

Der rekombinante Mikroorganismus kann nach bekannten Verfahren kultiviert und fermentiert werden. Bakterien können beispielsweise in TB- oder LB-Medium und bei einer Temperatur von 20 bis 40°C und einem pH-Wert von 6 bis 9 vermehrt werden. Im Einzelnen werden geeignete Kultivierungsbedingungen beispielsweise

5 in T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) beschrieben.

Die Zellen werden dann, falls die Monooxygenase nicht in das Kulturmedium sezerniert wird, aufgeschlossen und das Enzym nach bekannten Proteinisolierungsverfahren aus dem Lysat gewonnen. Die Zellen können wahlweise durch hochfrequenten Ultraschall, durch hohen Druck, wie z.B. in einer French-Druckzelle, durch Osmolyse, durch Einwirkung von Detergenzien, lytischen Enzymen oder organischen Lösungsmitteln, durch Homogenisatoren oder durch Kombination mehrerer der aufgeführten Verfahren aufgeschlossen werden.

15

Eine Aufreinigung der Monooxygenase kann mit bekannten, chromatographischen Verfahren erzielt werden, wie Molekularsieb-Chromatographie (Gelfiltration), wie Q-Sepharose-Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und hydrophobe Chromatographie, sowie mit anderen üblichen Verfahren wie Ultrafiltration, Kristallisation, Aussalzen, Dialyse und nativer Gelelektrophorese. Geeignete Verfahren werden beispielsweise in Cooper, F. G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York oder in Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin beschrieben.

25 Besonders vorteilhaft ist es, zur Isolierung des rekombinanten Proteins Vektorsysteme oder Oligonukleotide zu verwenden, die die cDNA um bestimmte Nucleotidsequenzen verlängern und damit für veränderte Polypeptide oder Fusionsproteine kodieren, die einer einfacheren Reinigung dienen. Derartige geeignete Modifikationen sind beispielsweise als Anker fungierende sogenannte "Tags", wie z.B. die als
30 Hexa-Histidin-Anker bekannte Modifikation oder Epitope, die als Antigene von Antikörpern erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Diese Anker können zur Anheftung der Proteine an einen festen Träger, wie z.B. einer

Polymermatrix, dienen, die beispielsweise in einer Chromatographiesäule eingefüllt sein kann, oder an einer Mikrotiterplatte oder an einem sonstigen Träger verwendet werden kann.

5 Gleichzeitig können diese Anker auch zur Erkennung der Proteine verwendet werden. Zur Erkennung der Proteine können außerdem übliche Marker, wie Fluoreszenzfarbstoffe, Enzymmarker, die nach Reaktion mit einem Substrat ein detektierbares Reaktionsprodukt bilden, oder radioaktive Marker, allein oder in Kombination mit den Ankern zur Derivatisierung der Proteine verwendet werden.

10

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation organischer Verbindungen obigen Typs.

Wird die Umsetzung mit einem rekombinanten Mikroorganismus durchgeführt, so 15 erfolgt vorzugsweise zunächst die Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff und in einem Komplexmedium, wie z.B. TB- oder LB- Medium bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 20 °C oder mehr, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9, bis eine ausreichende Zelldichte erreicht ist. Um die Oxidationsreaktion besser steuern zu können, bevorzugt man die Verwendung eines induzierbaren 20 Promoters. Die Kultivierung wird nach Induktion der Monooxygenaseproduktion in Gegenwart von Sauerstoff 12 Stunden bis 3 Tage fortgesetzt.

Wird die erfindungsgemäße Umsetzung dagegen mit gereinigtem oder angereichertem Enzym durchgeführt so löst man das erfindungsgemäße Enzym in einem 25 exogenes Substrat enthaltenden Medium (etwa 0,01 bis 10 mM, oder 0,05 bis 5 mM), und führt die Umsetzung, vorzugsweise in Gegenwart von Sauerstoff, bei einer Temperatur von etwa 10 °C oder mehr, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 (wie z.B. eingestellt mit 100 bis 200 mM Phosphat- oder Tris-Puffer), sowie in Gegenwart eines Reduktionsmittels durch, wobei das Substrat-haltige Medium außerdem bezogen auf das zu oxidierende Substrat einen etwa 10-bis 100-fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten enthält. Bevorzugtes Reduktionsmittel ist 30 NADPH.

Beim erfindungsgemäßen Substratoxidationsprozess wird im Reaktionsmedium enthaltener oder zugesetzter Sauerstoff reduktiv enzymatisch gespalten. Die erforderlichen Reduktionsäquivalente werden von dem zugesetzten Reduktionsmittel (Elektronendonator) zur Verfügung gestellt.

5

Das gebildete Oxidationsprodukt kann dann in herkömmlicher Weise, wie z.B. durch Extraktion oder Chromatographie, vom Medium abgetrennt und gereinigt werden.

10 Folgende nichtlimitierende Beispiele beschreiben spezielle Ausführungsformen der Erfindung.

15

—Allgemeine experimentelle Angaben:

a) Allgemeine Klonierungsverfahren

20

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) a.a.O. beschrieben durchgeführt.

b) Polymerasekettenreaktion (PCR)

25

PCR wurde nach Standardprotokoll mit folgendem Standardansatz durchgeführt:

8 µl dNTP-Mix (200µM), 10 µl Taq-Polymerase-Puffer (10 x) ohne MgCl₂, 8µl MgCl₂ (25mM), je 1 µl Primer (0,1 µM), 1µl zu amplifizierende DNA, 2,5 U Taq-Polymerase (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen), ad 100 µl demineralisiertes Wasser.

30

c) Kultivierung von *E.coli*

Die Kultivierung von rekombinanten *E. coli*-Stämme DH5 Δ wurde in LB-Amp Medium (Trypton 10,0g, NaCl 5,0 g, Hefeextrakt 5,0 g, Ampicillin 100 g/ml H₂O ad 1000 ml) bei 37 °C kultiviert. Dazu wurde jeweils eine Kolonie mittels Impföse von einer Agarplatte in 5 ml LB-Amp überführt. Nach ca. 18 h Stunden Kultivierung bei einer

5 Schüttelfrequenz von 220 Upm wurden 400 ml Medium in einem 2-l-Kolben mit 4 ml Kultur inkuliert. Die Induktion der P450-Expression in *E. coli* erfolgte nach Erreichen eines OD578-Wertes zwischen 0,8 und 1,0 durch eine drei- bis vierstündige Hitzeschockinduktion bei 42 °C.

10 d) Zellaufschluß

Zellpellets mit einer Biofeuchtmasse von bis zu 15 g *E. coli* DH5 Δ wurden auf Eis aufgetaut und in 25 ml Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5, 1 mM EDTA) oder Tris/HCl Puffer (50 mM, pH 7,5, 1 mM EDTA) suspendiert. Mittels dreiminütiger Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier W250, (Dietzenbach, Deutschland), Leistungsabgabe 80 W, Arbeitsintervall 20 %) wurde die auf Eis gekühlte *E. coli*-Zellsuspension aufgeschlossen. Vor der Proteinreinigung wurde die Zellsuspension für 20 min bei 32 500 g zentrifugiert und durch einen 0,22 mm Sterivex-GP-Filter (Millipore) filtriert, wobei man einen Rohextrakt erhält.

20

Beispiel 1:

Klonierung und Expression von P450 aus *Thermus thermophilus* HB27 und den His-tag-Derivaten davon

25

1. Klonierung von P450 aus *Thermus thermophilus* HB27

Die kodierende P450-Sequenz (blunt ended) wurde in die HinclI-Schnittstelle des Plasmids pTZ19R (MBI Fermentas) einkloniert. Aus dem so erhaltenen Plasmid

30 TTHB66 wurde die kodierende P450-Sequenz mit Hilfe der PCR amplifiziert. Dazu wurden folgende Primer verwendet:

a) 30-mer sense-Oligonucleotid, enthaltend die NdeI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des P450-ATG-Startcodons:
 5'-CGAAGCT**CATAT**GAAGCGC**TTT**CCCTGAG (SEQ ID NO:7).

5 b) 30-mer antisense-Oligonucleotid, enthaltend die EcoRI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des TGA-Stopcodons: 5'-
 GCGA**ATT**CACGCCCGCAC**CTC**CTCC**CT**AGG (SEQ ID NO:8).

Das resultierende Fragment wurde in die NdeI-Schnittstellen des Vektors
 10 pCYTEXP1 (Plasmid mit dem temperaturinduzierbaren P_{RPL} -Promotorsystem des
 Bakteriophagen 8 (Belev T.N., et al., Plasmid (1991) 26:147)) kloniert und in E. coli
 DH-5 α (Clontech, Heidelberg) transformiert.

E. coli DH-5 α , enthaltend das interessierende Plasmid wurde in LB-Medium in Gegenwart von Ampicillin inkubiert und die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Ein Teil der Probe wurde in frisches LB-Medium (in Gegenwart von Ampicillin) inkubiert und die resultierende Kultur wurde bei 37 °C bis zu OD = 0,9 kultiviert. Die Induktion erfolgte durch Erhöhung der Temperatur auf 42 °C über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Veränderung des P450-Gehaltes während der Expression
 20 wurde anhand von Messungen des CO-Differenzspektrums bestimmt.

Expressionszeit [h]	$\Delta A_{450-490}$	P450 Konzentration [μM]
4	0,092	0,056
8	0,176	0,106
24	0,106	0,064

2. Klonierung von P450 aus *Thermus thermophilus* HB27 mit N-terminalem His-
 25 tag

Die kodierende P450-Sequenz wurde durch PCR aus dem Plasmid TTHB66 unter Verwendung folgender Primer amplifiziert:

(a) 50-mer sense-Oligonucleotid, enthaltend die NdeI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des P450 ATG-Startcodons und die tag-codierenden Codons (unterstrichen):

5 5'-CGAAGCTCATATGCATCACCATCATCATCACAAGCGCTTTC (SEQ ID NO:9);

(b) 30-mer antisense-Oligonucleotid, enthaltend die EcoRI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des TGA-Stop-Codons :

10 5'-GCGAATTCACGCCGCACCTCCCTCCCTAGG (SEQ ID NO:8).

Das resultierende Fragment wurde in die NdeI- und EcoRI-Schnittstellen des Vektors p-CYTEXP1 kloniert und in *E. coli* DH-5 α exprimiert.

15 E. coli DH-5 α , enthaltend das interessierende Plasmid, wurde in LB-Medium in Gegenwart von Ampicillin inkkuliert und die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C inkuliert. Ein Teil der Probe wurde in frisches LB-Medium (in Gegenwart von Ampicillin) inkkuliert und die resultierende Kultur wurde bei 37 °C bis zu OD = 0,9 kultiviert. Die Induktion erfolgte durch Erhöhung der Temperatur auf 42 °C über einen Zeitraum
20 von 24 Stunden. Die Veränderung des P450-Gehaltes während der Expression wurde anhand von Messungen des CO-Differenzspektrums bestimmt.

Expressionszeit [h]	$\Delta A_{450-490}$	P450 Konzentration [μ M]
4	ND	ND
8	0,097	0,073
24	0,111	0,073

3. Clonierung von P450 aus *Thermus thermophilus* HB27 mit C-terminalem His-tag
25

Die kodierende P450-Sequenz wurde durch PCR aus dem Plasmid TTHB66 unter Verwendung der folgenden Primer amplifiziert:

(a) 30-mer sense-Oligonucleotid, enthaltend die NdeI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des P450 ATG-Start-Codons:

5 5'-CGAAGCTCATATGAAGCGC~~TT~~CCCTGAG (SEQ ID NO:7)

(b) 47-mer antisense-Oligonucleotid, enthaltend die EcoRI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des TGA-Stop-Codons sowie die unterstrichene tag-codierende Teilsequenz:

10 5'-CGGAATTCAGTGATGATGGTGATGCGGCCGCACCTC (SEQ ID NO:10).

Das resultierende Fragment wurde in die NdeI- und EcoRI-Schnittstellen des Vektors p-CYTEXP1 cloniert und in *E. coli* DH-5 α exprimiert.

15 E. coli DH-5 α , enthaltend das interessierende Plasmid wurde in LB-Medium in Gegenwart von Ampicillin inkkuliert und die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C inkuliert. Ein Teil der Probe wurde in frisches LB-Medium (in Gegenwart von Ampicillin) inkuliert und die resultierende Kultur wurde bei 37 °C bis zu OD = 0,9 kultiviert. Die Induktion erfolgte durch Erhöhung der Temperatur auf 42 °C über einen Zeitraum 20 von 24 Stunden. Die Veränderung des P450-Gehaltes während der Expression wurde anhand von Messungen des CO-Differenzspektrums bestimmt.

Expressionszeit [h]	$\Delta A_{450-490}$	P450 Konzentration [μ M]
4	ND	ND
8	0,1	0,075
24	ND	ND

25 Beispiel 2:

Bestimmung der Thermostabilität von P450 aus *Thermus thermophilus* im Vergleich zu P450 BM3

Die beiden Enzyme wurden jeweils 30 Minuten in Tris/HCl-Puffer pH 7,5, 25mM bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend abgekühlt und die P450 Konzentration wurde spektrometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefaßt und in Figur 2 graphisch dargestellt.

5

Temperatur [°C]		30	40	50	60
P450 Konzentration [%]	P450 thermus	100	89	29	22
	P450 BM3	92	63	0	0

10 Wie man den Versuchsergebnissen entnimmt, besitzt das erfindungsgemäße Enzym nach 30-minütiger Inkubation bei allen Temperaturen eine signifikant höherer Temperaturstabilität.

Beispiel 3:

15 Biotransformationsexperimente

Der endogene Redoxpartner für die erfindungsgemäße Cytochrom P450 aus *T. thermophilus* konnte bisher noch nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Es konnte jedoch beispielsweise Enzymaktivität bei der Hydroxylierung von β - und/oder α -Ionon beobachtet werden. Mit β -Ionon als Substrat konnte die Umwandlung zu einem Hauptprodukt beobachtet werden, wohingegen α -Ionon zu einem Produktgemisch umgesetzt wurde. Durch Vergleich mit synthetischen Standards konnte festgestellt werden, daß das Hauptprodukt der β -Ionon-Umwandlung 4-Hydroxy- β -Ionon ist.

25

Vorkulturen von *T. thermophilus* [5 ml Medium Tt (2 g Hefeextrakt, 1g Trypton, 1g NaCl in 500 ml entionisiertem Wasser)] wurden aus Agarplatten-Kulturen inkuliert und 24 Stunden bei 65°C unter Schütteln (150 Upm) inkubiert. Anschließend wurde 100 ml Medium Tt mit der Vorkultur inkuliert und bei 65°C unter Schütteln inkubiert.

30

β -Ionon (107 μ l/ml Kultur) wurde jeder Kultur nach 24 Stunden zugesetzt. Die Kultivierung wurde 78 Stunden fortgesetzt. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert und der Überstand mit Diethyläther extrahiert. Der Extrakt wurde durch GC und TLC analysiert. Kontrollkulturen ohne Substrat wurden unter den gleichen Bedingungen hergestellt und analysiert.

25
Patentansprüche

1. Cytochrom P450 Monooxygenase, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz aufweist, welche eine Teilsequenz von Aminosäurerest 5 Pro328 bis Glu345 gemäß SEQ ID NO:2 umfasst.
2. Cytochrom P450 Monooxygenase nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz aufweist, welche außerdem eine Teilsequenz von Aminosäurerest Val216 bis Ala227 gemäß SEQ ID NO:2 umfasst.
3. Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz aufweist, welche wenigstens eine weitere Teilsequenz umfasst, die ausgewählt ist unter Teilsequenzen von wenigstens 10 aufeinanderfolgenden Aminosäuren aus den durch die Aminosäurereste Met1 bis Phe327 und Gly346 bis Ala389 gemäß SEQ ID NO:2 vorgegebenen Sequenzbereichen.
4. Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz aufweist, welche im wesentlichen SEQ ID NO: 2 entspricht.
5. Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der vorhergehenden Ansprüche aus Bakterien der Gattung *Thermus* sp..
6. Cytochrom P450 Monooxygenase nach Anspruch 5, aus einer Bakterium der Spezies *Thermus thermophilus*.
7. Oligonukleotid, welches mit einer Nukleinsäuresequenz hybridisiert, die für eine Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der vorhergehenden Ansprüche kodiert.
8. Oligonukleotid nach Anspruch 7, welches eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die im wesentlichen komplementär ist zu einem wenigstens 45 aufeinanderfol-

26

gende Nukleotidreste umfassenden Nukleotidsequenzbereich gemäß SEQ ID NO:1.

9. Polynukleotid, welches mit einem Oligonukleotid nach Anspruch 7 oder 8 hybridisiert und für eine Cytochrom P450 Monooxygenase kodiert.
10. Polynukleotid, das für eine Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 kodiert, sowie dazu komplementäre Polynukleotide.
- 10 11. Polynukleotid nach Anspruch 10 mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, sowie die dazu komplementäre Nukleinsäuresequenz.
12. Expressionskassette, umfassend wenigstens eine regulatorische Nukleinsäuresequenz operativ verknüpft mit einem Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 9 bis 11.
- 15 13. Rekombinanter Vektor, der ein Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 9 bis 11 oder eine Expressionskassette gemäß Anspruch 12 trägt.
- 20 14. Mikroorganismus, enthaltend wenigstens einen rekombinanten Vektor gemäß Anspruch 13.
15. Verfahren zur Herstellung einer Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei man einen Mikroorganismus, welcher Cytochrom P450 Monooxygenase produziert, kultiviert und die Monooxygenase aus der Kultur isoliert.
- 25 30 16. Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation einer organischen Verbindung, wobei man diese Verbindung mit wenigstens einer Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der Ansprüche 1 bis 6 umsetzt.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man
a1) einen rekombinanten Mikroorganismus nach Anspruch 14 in einem

27

Kulturmedium, in Gegenwart der exogenen oder intermediär gebildeten organischen Verbindung, welche ein Substrat der Monooxygenase ist, kultiviert; oder

5 a2) ein Substrat-haltiges Reaktionsmedium mit einer Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der Ansprüche 1 bis 6 inkubiert; und

 b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.

10 18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das exogene oder intermediär gebildete Substrat ausgewählt ist unter

15 a) gegebenenfalls substituierten N-, O- oder S-heterocyclischen ein-, zwei- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen;

 b) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen Aromaten;

 c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen;

20 d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkenen; und

 e) aliphatischen (terminal gesättigten) Carbonsäuren.

19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß man die Oxidation durch Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von mindestens etwa 20°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt.

25 20. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als exogenes Substrat wenigstens eine Verbindung, ausgewählt unter den oben definierten Gruppen a) bis e), einem Medium zusetzt und die Oxidation durch enzymatische Umsetzung des substrathaltiges Mediums in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Temperatur von mindestens etwa 20°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt, wobei das substrathaltige Medium außerdem bezogen auf das Substrat einen etwa 10-bis 100-fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten enthält.

30 21. Bioreaktor, umfassend ein Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder einen rekombinanten Mikroorganismus nach Anspruch 14 in immobilisierter Form.

22. Verwendung einer Cytochrom P450 Monoxygenase nach einem der Ansprüche 1 bis 6, eines Vektors nach Anspruch 13, oder eines Mikroorganismus nach Anspruch 14 zur mikrobiologischen Oxidation von

5

- a) gegebenenfalls substituierten N-, O- oder S-heterocyclischen ein-, zwei- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen;
- b) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen Aromaten;
- c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen;
- 10 d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkenen und/oder
- e) aliphatischen Carbonsäuren.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Neue thermophile Cytochrom P450 Monooxygenasen

<130> M/41524

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1170

<212> DNA

<213> Thermus thermophilus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1170)

<400> 1

atg	aag	cgc	ctt	tcc	ctg	agg	gag	gcc	tgg	ccc	taa	aaa	gac	ctc	
Met	Lys	Arg	Leu	Ser	Leu	Arg	Glu	Ala	Trp	Pro	Tyr	Leu	Lys	Asp	Leu
1	5	10	15												

48

cag	caa	gat	ccc	ctc	gcc	gtc	ctg	gct	tgg	ggc	cg	gg	gcc	cac	ccc
Gln	Gln	Asp	Pro	Leu	Ala	Val	Leu	Leu	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala	His	Pro
20	25	30													

96

cg	ctc	tcc	ctt	ccc	ctg	ccc	cgc	ttc	ccc	ctg	gcc	otg	atc	ttt	gac
Arg	Leu	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Arg	Phe	Pro	Leu	Ala	Ile	Phe	Asp	
35	40	45													

144

ccc	gag	ggg	gtg	gag	ggg	gct	ctc	gcc	gag	ggg	acc	acc	aag	gcc	
Pro	Glu	Gly	Val	Glu	Gly	Ala	Leu	Leu	Ala	Glu	Gly	Thr	Thr	Lys	Ala
50	55	60													

192

acc	tcc	cag	tac	cgg	gcc	ctc	tcc	cgc	ctc	acc	ggg	agg	ggc	ctc	ctc
Thr	Phe	Gln	Tyr	Arg	Ala	Leu	Ser	Arg	Leu	Thr	Gly	Arg	Gly	Leu	Leu
65	70	75	80												

240

acc	gac	tgg	ggg	gaa	agc	tgg	aag	gag	gct	cg	aag	gcc	ctc	aaa	gac
Thr	Asp	Trp	Gly	Glu	Ser	Trp	Lys	Glu	Ala	Arg	Lys	Ala	Leu	Lys	Asp
85	90	95													

288

ccc	tcc	ctg	ccg	aag	aac	gtc	cgc	ggc	tac	cgg	gag	gcc	atg	gag	gag
Pro	Phe	Leu	Pro	Lys	Asn	Val	Arg	Gly	Tyr	Arg	Glu	Ala	Met	Glu	Glu
100	105	110													

336

gag	gcc	cg	gg	cc	tcc	tcc	gg	gg	gag	gag	gg	gg	gac	ctg	
Glu	Ala	Arg	Ala	Phe	Phe	Gly	Glu	Trp	Arg	Gly	Glu	Glu	Arg	Asp	Leu
115	120	125													

384

gac	cac	gag	atg	ctc	gcc	ctc	tcc	ctg	cgc	ctc	ctc	ggg	cg	gg	cc
Asp	His	Glu	Met	Leu	Ala	Leu	Ser	Leu	Arg	Leu	Leu	Gly	Arg	Ala	Leu
130	135	140													

432

ttc	ggg	aag	ccc	ctc	tcc	cca	agc	ctc	gag	cac	gcc	ctt	aag	gcc	480		
Phe	Gly	Lys	Pro	Leu	Ser	Pro	Ser	Leu	Ala	Glu	His	Ala	Leu	Lys	Ala		
145			150			155			160								
ctg	gac	cg	atc	atg	gcc	cag	acc	agg	agc	ccc	ctg	gcc	ctc	ctg	gac	528	
Leu	Asp	Arg	Ile	Met	Ala	Gln	Thr	Arg	Ser	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Asp		
			165				170			175							
ctg	gcc	gcc	gaa	gcc	cgc	ttc	cg	aag	gac	cg	gg	gcc	ctc	tac	cgc	576	
Leu	Ala	Ala	Glu	Ala	Arg	Phe	Arg	Lys	Asp	Arg	Gly	Ala	Leu	Tyr	Arg		
			180				185			190							
gag	g	g	gaa	g	cc	ct	atc	gtc	ca	cc	cc	ttc	ca	cc	cg	624	
Glu	Ala	Ala	Leu	Ile	Leu	Val	His	Pro	Pro	Leu	Ser	His	Leu	Pro	Arg		
			195			200			205								
gag	cg	gc	ct	ag	gag	gc	gt	ac	ct	ct	gt	gc	gg	ca	gag	672	
Glu	Arg	Ala	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Thr	Leu	Leu	Val	Ala	Gly	His	Glu		
			210			215			220								
acg	gt	gc	ag	gc	ct	ac	tgg	tcc	ttt	ctc	ctc	ctc	tcc	ca	cg	720	
Thr	Val	Ala	Ser	Ala	Leu	Thr	Trp	Ser	Phe	Leu	Leu	Leu	Ser	His	Arg		
			225			230			235			240					
ccg	gac	tgg	cag	aag	cg	gt	gc	gag	ag	gag	g	gc	cc	gc	768		
Pro	Asp	Trp	Gln	Lys	Arg	Val	Ala	Glu	Ser	Glu	Ala	Ala	Leu	Ala			
			245			250			255								
gcc	t	tc	cag	g	g	cc	ct	ag	ct	ca	cc	tt	gg	atc	ct	ac	816
Ala	Phe	Gln	Ala	Leu	Arg	Leu	Tyr	Pro	Pro	Ala	Trp	Ile	Leu	Thr			
			260			265			270								
cgg	agg	ct	gaa	agg	cc	ct	ct	ct	gg	gag	gac	cg	ct	cc	cg	864	
Arg	Arg	Leu	Glu	Arg	Pro	Leu	Leu	Gly	Glu	Asp	Arg	Leu	Pro	Pro			
			275			280			285								
ggc	acc	acc	ct	gt	ct	tcc	cc	ta	gt	ac	cag	agg	atc	ca	tc	912	
Gly	Thr	Thr	Leu	Val	Leu	Ser	Pro	Tyr	Val	Thr	Gln	Arg	Leu	His	Phe		
			290			295			300								
ccc	gat	gg	gag	gc	tt	cg	cc	gag	cg	cc	tt	gg	at	cc	gc	960	
Pro	Asp	Gly	Glu	Ala	Phe	Arg	Pro	Glu	Arg	Phe	Leu	Glu	Glu	Arg	Gly		
			305			310			315			320					
acc	c	c	tcg	gg	cc	ta	ttc	ccc	ttt	gg	ct	gg	gg	ca	gg	1008	
Thr	Pro	Ser	Gly	Arg	Tyr	Phe	Pro	Phe	Gly	Leu	Gly	Gln	Arg	Leu	Cys		
			325			330			335								
ctg	gg	gg	gac	ttc	gc	ct	gag	gg	cc	atc	gt	cc	agg	gc	1056		
Leu	Gly	Arg	Asp	Phe	Ala	Leu	Glu	Gly	Pro	Ile	Val	Leu	Arg	Ala			
			340			345			350								
ttc	ttc	cgc	cgc	ttc	cgc	cta	gac	ccc	ctc	ccc	ttc	ccc	cgg	gtc	ctc	1104	
Phe	Phe	Arg	Arg	Phe	Arg	Leu	Asp	Pro	Leu	Pro	Phe	Pro	Arg	Val	Leu		
			355			360			365								
gcc	cag	gtc	acc	ct	agg	cc	gaa	gg	cc	ttt	ccc	g	cg	cc	tg	1152	
Ala	Gln	Val	Thr	Leu	Arg	Pro	Glu	Gly	Gly	Leu	Pro	Ala	Arg	Pro	Arg		
			370			375			380								
gag	gag	gt	gg	cg	g	tg									1170		

Glu Glu Val Arg Ala
385 390

<210> 2
<211> 389
<212> PRT
<213> *Thermus thermophilus*

<400> 2
Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu
1 5 10 15

Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro
20 25 30

Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp
35 40 45

Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala
50 55 60

Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu
65 70 75 80

Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp
85 90 95

Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu
100 105 110

Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Glu Arg Asp Leu
115 120 125

Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu
130 135 140

Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala Glu His Ala Leu Lys Ala
145 150 155 160

Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala Leu Leu Asp
165 170 175

Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg Gly Ala Leu Tyr Arg
180 185 190

Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu Ser His Leu Pro Arg
195 200 205

Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu Leu Val Ala Gly His Glu
210 215 220

Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe Leu Leu Leu Ser His Arg
225 230 235 240

Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ala Leu Ala
245 250 255

Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp Ile Leu Thr
260 265 270

Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly Glu Asp Arg Leu Pro Pro
 275 280 285
 Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val Thr Gln Arg Leu His Phe
 290 295 300
 Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu Arg Gly
 305 310 315 320
 Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly Leu Gly Gln Arg Leu Cys
 325 330 335
 Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala
 340 345 350
 Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu Pro Phe Pro Arg Val Leu
 355 360 365
 Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg
 370 375 380
 Glu Glu Val Arg Ala
 385

<210> 3

<211> 1188

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)...(21)

<223> His tag

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:N-terminal
his tagged

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1188)

<400> 3

atg cat cac cat cat cac aag cgc ctt tcc ctg agg gag gcc tgg 48
 Met His His His His Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp
 1 5 10 15

ccc tac ctg aaa gac ctc cag caa gat ccc ctc gcc gtc ctg ctg gcg 96
 Pro Tyr Leu Lys Asp Leu Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala
 20 25 30

tgg ggc cgg gcc cac ccc egg ctc ttc ctt ccc ctg ccc cgc ttc ccc 144
 Trp Gly Arg Ala His Pro Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro
 35 40 45

ctg gcc ctg atc ttt gac ccc gag ggg gtg gag ggg gcg ctc ctc gcc 192
 Leu Ala Leu Ile Phe Asp Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala
 50 55 60

gag	ggg	acc	acc	aag	gcc	acc	ttc	cag	taa	cggt	ggcc	ctc	tcc	cgcc	ctc	240
Glu	Gly	Thr	Thr	Lys	Ala	Thr	Phe	Gln	Tyr	Arg	Ala	Leu	Ser	Arg	Leu	
65							70									80
acg	ggg	agg	ggc	ctc	ctc	acc	gac	tgg	ggg	gaa	agc	tgg	aag	gag	ggc	288
Thr	Gly	Arg	Gly	Leu	Leu	Thr	Asp	Trp	Gly	Glu	Ser	Trp	Lys	Glu	Ala	
																85
																90
																95
ccg	aag	gcc	ctc	aaa	gac	ccc	ttc	ctg	ccg	aag	aac	gtc	cgcc	ggc	tac	336
Arg	Lys	Ala	Leu	Lys	Asp	Pro	Phe	Leu	Pro	Lys	Asn	Val	Arg	Gly	Tyr	
																100
																105
																110
ccg	gag	gcc	atg	gag	gag	gag	gcc	ccg	gcc	ttc	ttc	ggg	gag	tgg	ccg	384
Arg	Glu	Ala	Met	Glu	Glu	Glu	Ala	Arg	Ala	Phe	Phe	Gly	Glu	Trp	Arg	
																115
																120
																125
ggg	gag	gag	ccg	gac	ctg	gac	cac	gag	atg	ctc	gcc	ctc	tcc	ctg	ccg	432
Gly	Glu	Glu	Arg	Asp	Leu	Asp	His	Glu	Met	Leu	Ala	Leu	Ser	Leu	Arg	
																130
																135
																140
ctc	ctc	ggg	ccg	gcc	ctc	ttc	ggg	aag	ccc	ctc	tcc	cca	agc	ctc	ggc	480
Leu	Leu	Gly	Arg	Ala	Leu	Phe	Gly	Lys	Pro	Leu	Ser	Pro	Ser	Leu	Ala	
																145
																150
																155
																160
gag	cac	gcc	ctt	aag	gcc	ctg	gac	egg	atc	atg	gcc	cag	acc	agg	agg	528
Glu	His	Ala	Leu	Lys	Ala	Leu	Asp	Arg	Ile	Met	Ala	Gln	Thr	Arg	Ser	
																165
																170
																175
ccc	ctg	gcc	ctc	ctg	gac	ctg	gcc	gaa	gcc	ccg	tcc	cggt	aag	gac		576
Pro	Leu	Ala	Leu	Lys	Asp	Leu	Ala	Ala	Glu	Ala	Arg	Phe	Arg	Lys	Asp	
																180
																185
																190
ccg	ggg	gcc	ctc	tac	cggt	gag	ccg	gaa	gcc	ctc	atc	gtc	cac	ccg	ccc	624
Arg	Gly	Ala	Leu	Tyr	Arg	Glu	Ala	Glu	Ala	Leu	Ile	Val	His	Pro	Pro	
																195
																200
																205
ctc	tcc	cac	ctt	ccc	cgt	gag	ccg	gcc	ctg	agg	gcc	gtg	acc	ctc		672
Leu	Ser	His	Leu	Pro	Arg	Glu	Arg	Ala	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Thr	Leu	
																210
																215
																220
ctg	gtg	ccg	ggc	cac	gag	acg	gtg	ccg	agg	gcc	ctc	acc	tgg	tcc	ttt	720
Leu	Val	Ala	Gly	His	Glu	Thr	Val	Ala	Ser	Ala	Leu	Thr	Trp	Ser	Phe	
																225
																230
																235
																240
ctc	ctc	ctc	tcc	cac	ccg	ccg	gac	tgg	cag	aag	ccg	gtg	gcc	gag	agg	768
Leu	Leu	Leu	Ser	His	Arg	Pro	Asp	Trp	Gln	Lys	Arg	Val	Ala	Glu	Ser	
																245
																250
																255
gag	gag	ccg	gcc	ctc	gcc	ttc	cag	gag	ccg	ctg	agg	ctc	tac	ccc		816
Glu	Glu	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Phe	Gln	Glu	Ala	Leu	Arg	Leu	Tyr	Pro	
																260
																265
																270
ccc	gcc	tgg	atc	ctc	acc	ccg	agg	ctg	gaa	agg	ccc	ctc	ctc	ctg	ggg	864
Pro	Ala	Trp	Ile	Leu	Thr	Arg	Arg	Leu	Glu	Arg	Pro	Leu	Leu	Leu	Gly	
																275
																280
																285
gag	gac	ccg	ctc	ccc	ccg	ggc	acc	acc	ctg	gtc	ctc	tcc	ccc	tac	gtg	912
Glu	Asp	Arg	Leu	Pro	Pro	Gly	Thr	Thr	Ile	Val	Leu	Ser	Pro	Tyr	Val	
																290
																295
																300
acc	cag	agg	ctc	cac	ttc	ccc	gat	ggg	gag	gcc	ttc	ccg	ccc	gag	ccg	960

Thr Gln Arg Leu His Phe Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg
 305 310 315 320

ttc ctg gag gaa agg ggg acc cct tcg ggg cgc tac ttc ccc ttt ggc 1008
 Phe Leu Glu Arg Gly Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly
 325 330 335

ctg ggg cag agg ctc tgc ctg ggg cgg gac ttc gcc ctc ctc gag ggc 1056
 Leu Gly Gln Arg Leu Cys Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly
 340 345 350

ccc atc gtc ctc agg gcc ttc ttc cgc cga ttc cgc cta gac ccc ctc 1104
 Pro Ile Val Leu Arg Ala Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu
 355 360 365

ccc ttc ccc cgg gtc ctc gcc cag gtc acc ctg agg ccc gaa ggc ggg 1152
 Pro Phe Pro Arg Val Leu Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly
 370 375 380

ctt ccc gcg cgg cct agg gag gag gtg cgg gcg tga 1188
 Leu Pro Ala Arg Pro Arg Glu Glu Val Arg Ala
 385 390 395

<210> 4
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:N-terminal
 his tagged

<400> 4
 Met His His His His His Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp
 1 5 10 15

Pro Tyr Leu Lys Asp Leu Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala
 20 25 30

Trp Gly Arg Ala His Pro Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro
 35 40 45

Leu Ala Leu Ile Phe Asp Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala
 50 55 60

Glu Gly Thr Thr Lys Ala Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu
 65 70 75 80

Thr Gly Arg Gly Leu Leu Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala
 85 90 95

Arg Lys Ala Leu Lys Asp Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr
 100 105 110

Arg Glu Ala Met Glu Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg
 115 120 125

Gly Glu Glu Arg Asp Leu Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg
 130 135 140

Leu Leu Gly Arg Ala Leu Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala
 145 150 155 160

Glu His Ala Leu Lys Ala Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser
 165 170 175
 Pro Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp
 180 185 190
 Arg Gly Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro
 195 200 205
 Leu Ser His Leu Pro Arg Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu
 210 215 220
 Leu Val Ala Gly His Glu Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe
 225 230 235 240
 Leu Leu Leu Ser His Arg Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser
 245 250 255
 Glu Glu Ala Ala Leu Ala Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro
 260 265 270
 Pro Ala Trp Ile Leu Thr Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly
 275 280 285
 Glu Asp Arg Leu Pro Pro Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val
 290 295 300
 Thr Gln Arg Leu His Phe Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg
 305 310 315 320
 Phe Leu Glu Glu Arg Gly Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly
 325 330 335
 Leu Gly Gln Arg Leu Cys Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly
 340 345 350
 Pro Ile Val Leu Arg Ala Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu
 355 360 365
 Pro Phe Pro Arg Val Leu Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly
 370 375 380
 Leu Pro Ala Arg Pro Arg Glu Glu Val Arg Ala
 385 390 395

<210> 5

<211> 1168

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> (1168)..(1165)

<223> His tag

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:C-terminal
His-tagged

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1188)

<400> 5

atg aag cgc ctt tcc ctg agg gag gcc tgg ccc tac ctg aaa gac ctc 48
 Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu
 1 5 10 15

cag caa gat ccc ctc gcc gtc ctg ctg gcg tgg ggc cgg gcc cac ccc 96
 Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro
 20 25 30

cgg ctc ttc ctt ccc ctg ccc cgc ttc ccc ctg gcc ctg atc ttt gac 144
 Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp
 35 40 45

ccc gag ggg gtg gag ggg gcg ctc ctc gcc gag ggg acc acc aag gcc 192
 Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala
 50 55 60

acc ttc cag tac cgg gcc ctc tcc cgc ctc acg ggg agg ggc ctc ctc 240
 Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu
 65 70 75 80

acc gac tgg ggg gaa agc tgg aag gag gcg cgc aag gcc ctc aaa gac 288
 Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp
 85 90 95

ccc ttc ctg ccc aag aac gtc cgc ggc tac cgg gag gcc atg gag gag 336
 Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu
 100 105 110

gag gcc cgg gcc ttc ttc ggg gag tgg cgg ggg gag gag cgg gac ctg 384
 Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Glu Arg Asp Leu
 115 120 125

gac cac gag atg ctc gcc ctc tcc ctg cgc ctc ctc ggg cgg gcc ctc 432
 Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu
 130 135 140

ttc ggg aag ccc ctc tcc cca agc ctc gcg gag cac gcc ctt aag gcc 480
 Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala Glu His Ala Leu Lys Ala
 145 150 155 160

ctg gac cgg atc atg gcc cag acc agg agc ccc ctg gcc ctc ctg gac 528
 Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala Leu Leu Asp
 165 170 175

ctg gcc gaa gcc cgc ttc cgg aag gac cgg ggg gcc ctc tac cgc 576
 Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg Gly Ala Leu Tyr Arg
 180 185 190

gag gcg gaa gcc ctc atc gtc cac ccc ctc tcc cac ctt ccc cga 624
 Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu Ser His Leu Pro Arg
 195 200 205

gag cgc gcc ctg agc gag gcc gtg acc ctc ctg gtg gcg ggc cac gag 672
 Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu Leu Val Ala Gly His Glu
 210 215 220

acg gtg gcg agc gcc ctc acc tgg tcc ttt ctc ctc ctc tcc cac cgc 720
 Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe Leu Leu Leu Ser His Arg
 225 230 235 240

 ccg gac tgg cag aag cgg gtg gcc gag agc gag gag ggc ctc gcc 768
 Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ala Leu Ala
 245 250 255

 gcc ttc cag gag gcc ctg agg ctc tac ccc ccc gcc tgg atc ctc acc 816
 Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp Ile Leu Thr
 260 265 270

 cgg agg ctg gaa agg ccc ctc ctc ctg gga gag gac cgg ctc ccc cgg 864
 Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Gly Glu Asp Arg Leu Pro Pro
 275 280 285

 ggc acc acc ctg gtc ctc tcc ccc tac gtg acc cag agg ctc cac ttc 912
 Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val Thr Gln Arg Leu His Phe
 290 295 300

 ccc gat ggg gag gcc ttc cgg ccc gag cgc ttc ctg gag gaa agg ggg 960
 Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu Arg Gly
 305 310 315 320

 acc cct tac ggg cgc tac ttc ccc ttt ggc ctg ggg cag agg ctc tgc 1008
 Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly Leu Gly Gln Arg Leu Cys
 325 330 335

 ctg ggg cgg gac ttc gcc ctc ctc gag ggc ccc atc gtc ctc agg gcc 1056
 Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala
 340 345 350

 ttc tta cgc cgc ttc cgc cta gac ccc ctc ccc ttc ccc cgg gtc ctc 1104
 Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu Pro Phe Pro Arg Val Leu
 355 360 365

 gcc cag gtc acc ctg agg ccc gaa ggc ggg ctt ccc ggc cgg cct agg 1152
 Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg
 370 375 380

 gag gag gtg cgg ggc cat cac cat cat cat cac tga 1188
 Glu Glu Val Arg Ala His His His His His His
 385 390 395

<210> 6
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:C-terminal
 His-tagged

<400> 6
 Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu
 1 5 10 15

 Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro
 20 25 30

 Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp

35	40	45	
Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu	Gly Thr Thr Lys Ala		
50	55	60	
Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu	Thr Gly Arg Gly Leu	Leu	
65	70	75	80
Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg	Lys Ala Leu Lys Asp		
85	90	95	
Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg	Glu Ala Met Glu Glu		
100	105	110	
Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly	Glu Glu Arg Asp Leu		
115	120	125	
Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu	Leu Gly Arg Ala Leu		
130	135	140	
Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala Glu	His Ala Leu Lys Ala		
145	150	155	160
Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro	Leu Ala Leu Leu Asp		
165	170	175	
Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg	Gly Ala Leu Tyr Arg		
180	185	190	
Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu	Ser His Leu Pro Arg		
195	200	205	
Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu	Leu Val Ala Gly His Glu		
210	215	220	
Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe	Leu Leu Leu Ser His Arg		
225	230	235	240
Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu	Glu Ala Ala Leu Ala		
245	250	255	
Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro	Pro Ala Trp Ile Leu Thr		
260	265	270	
Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu	Gly Glu Asp Arg Leu Pro	Pro	
275	280	285	
Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val	Thr Gln Arg Leu His Phe		
290	295	300	
Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg	Phe Leu Glu Glu Arg Gly		
305	310	315	320
Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly	Leu Gly Gln Arg Leu Cys		
325	330	335	
Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu	Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala		
340	345	350	
Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu	Pro Phe Pro Arg Val Leu		
355	360	365	

Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg
370 375 380

Glu Glu Val Arg Ala His His His His His His
385 390 395

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 7

cgaagctcat atgaagcgcc tttccctgag

30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 8

gcgaaattcac gccccacacat cctcccttagg

30

<210> 9

<211> 42

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 9

cgaagctcat atgcacatcacc atcatcatca caagcgcctt tc

42

<210> 10

<211> 42

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 10

cgaaattcag tcatgtatgtat ggtgtatgcgc ccgcacatcc tc

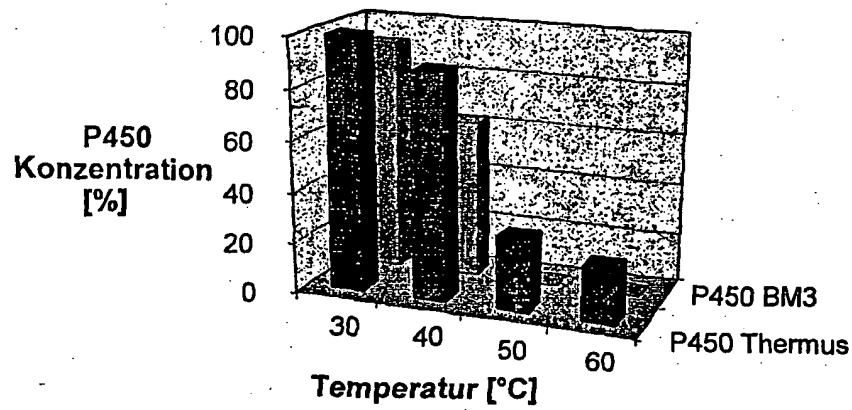
42

1/2

Fig. 1

2/2

Fig.2



BEST AVAILABLE COPY

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. April 2002 (25.04.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/033057 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/53, 9/02, C12Q 1/68, C12P 1/04

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/11958

(22) Internationales Anmeldedatum:
16. Oktober 2001 (16.10.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 51 175.9 16. Oktober 2000 (16.10.2000) — DE

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HAUER, Bernhard [DE/DE]; Merowingerstrasse 1, 67136 Fussgönheim (DE). SCHMID, Rolf [DE/DE]; In den Riedwiesen 3, 70329 Stuttgart (DE). MERKL, Rainer [DE/DE]; Silberkuhlenweg 5, 37120 Bovenden (DE). BLASCO, Francesca [IT/DE]; Achalmstrasse 91, 73734 Esslingen (DE).

(74) Anwälte: KINZEBACH, Werner usw.; Kinzebach & Partner, Sternwartstrasse 4, 81679 München (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 3. Oktober 2002

Zur Erklärung der Zwei-Buchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 02/033057 A3

(54) Title: CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASES CONSISTING OF THERMOPHILIC BACTERIA

(54) Bezeichnung: CYTOCHROM P450 MONOOXYGENASEN AUS THERMOPHILEN BAKTERIEN

(57) Abstract: The invention relates to novel cytochrome P450 monooxygenases consisting of thermophilic bacteria, especially the species *Thermus* sp., nucleotide sequences coding for the same, the recombinant production of said monooxygenases and the use thereof for the microbiological oxidation of organic compounds.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft neuartige cytochrom P450 Monooxygenasen aus thermophilen Bakterien, insbesondere der Gattung *Thermus* sp., dafür kodierende Nucleotidsequenzen, die rekombinante Herstellung dieser Monooxygenasen und deren Verwendung zur mikrobiologischen Oxidation organischer Verbindungen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/11958A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/53 C12N9/02 C12Q1/68 C12P1/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBL, SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 004, no. 085 (C-015), 18 June 1980 (1980-06-18) & JP 55 048391 A (MITSUBISHI CHEM IND LTD), 7 April 1980 (1980-04-07) abstract ---- -/-	1-15

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 July 2002

Date of mailing of the international search report

31/07/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sirim, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/11958

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KATO RYUICHI ET AL: "Characterization of a thermostable DNA photolyase from an extremely thermophilic bacterium, <i>Thermus thermophilus</i> HB27." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 179, no. 20, 1997, pages 6499-6503, XP002205721 ISSN: 0021-9193 page 6503, last paragraph -& DATABASE EMBL 'Online' 29 October 1997 (1997-10-29) Database accession no. AB001637 XP002205722 abstract ---	7-9, 12-14
X	DATABASE EMBL 'Online' 1 May 2000 (2000-05-01) SASAKI T ET AL: "Oryza sativa nipponbare (GA3) genomic DNA, chromosome 6, PC clone: P0514G12" Database accession no. Q9SNG3 XP002205723 abstract ---	1,5,6
X	DATABASE EMBL 'Online' 1 October 2000 (2000-10-01) ZAMORANO J. P. ET AL: "Isolation and characterization of cDNA for mRNAs regulated during cold storage of avocado fruit" Database accession no. Q9M4L1 XP002205724 abstract ---	1,5,6
X	DATABASE EMBL 'Online' 1 November 1998 (1998-11-01) ALTENBUCHNER J: "Amplifiable element AUD4 from <i>Streptomyces lividans</i> 66." Database accession no. 085697 XP002205725 abstract ---	1,2,5,6
X	DATABASE EMBL 'Online' 30 May 2000 (2000-05-30) FLEISCHMANN R. D. ET AL: "Whole genome comparison of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> clinical and laboratory strains" Database accession no. 069653 XP002205726 abstract ---	1-6 -/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/11958

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PARK H-J ET AL: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A NADH OXIDASE FROM THE THERMOPHILE THERMUS-THERMOPHILUS HB8" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 205, no. 3, 1992, pages 881-885, XP001084250 ISSN: 0014-2956 the whole document	1-15,21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/11958

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
JP 55048391	A 07-04-1980	JP 1359753 C	JP 61025352 B	30-01-1987 14-06-1986

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/11958

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/53 C12N9/02 C12Q1/68 C12P1/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBL, SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 004, no. 085 (C-015), 18. Juni 1980 (1980-06-18) & JP 55 048391 A (MITSUBISHI CHEM IND LTD), 7. April 1980 (1980-04-07) Zusammenfassung</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-15

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *'A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *'E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *'L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *'O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *'P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *'T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kolidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *'X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *'Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- *&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
16. Juli 2002	31/07/2002
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Sirim, P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/11958

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KATO RYUICHI ET AL: "Characterization of a thermostable DNA photolyase from an extremely thermophilic bacterium, <i>Thermus thermophilus</i> HB27." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 179, Nr. 20, 1997, Seiten 6499-6503, XP002205721 ISSN: 0021-9193 Seite 6503, letzter Absatz -& DATABASE EMBL 'Online' 29. Oktober 1997 (1997-10-29) Database accession no. AB001637 XP002205722 Zusammenfassung ---	7-9, 12-14
X	DATABASE EMBL 'Online' 1. Mai 2000 (2000-05-01) SASAKI T ET AL: "Oryza sativa nipponbare (GA3) genomic DNA, chromosome 6, PC clone: P0514G12" Database accession no. Q9SNG3 XP002205723 Zusammenfassung ---	1,5,6
X	DATABASE EMBL 'Online' 1. Oktober 2000 (2000-10-01) ZAMORANO J. P. ET AL: "Isolation and characterization of cDNA for mRNAs regulated during cold storage of avocado fruit" Database accession no. Q9M4L1 XP002205724 Zusammenfassung ---	1,5,6
X	DATABASE EMBL 'Online' 1. November 1998 (1998-11-01) ALTENBUCHNER J: "Amplifiable elment AUD4 from <i>Streptomyces lividans</i> 66." Database accession no. 085697 XP002205725 Zusammenfassung ---	1,2,5,6
X	DATABASE EMBL 'Online' 30. Mai 2000 (2000-05-30) FLEISCHMANN R. D. ET AL: "Whole genome comparison of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> clinical and laboratory strains" Database accession no. 069653 XP002205726 Zusammenfassung ---	1-6 -/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/11958

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	PARK H-J ET AL: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A NADH OXIDASE FROM THE THERMOPHILE THERMUS-THERMOPHILUS HB8" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 205, Nr. 3, 1992, Seiten 881-885, XP001084250 ISSN: 0014-2956 das ganze Dokument	1-15,21

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/11958

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 55048391	A 07-04-1980 JP	1359753 C 61025352 B	30-01-1987 14-06-1986